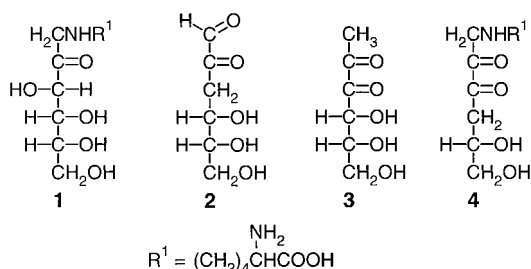


Unerwartete Carbonyl-Mobilität in Aminoketosen: der Schlüssel zu wichtigen Maillard-Quervernetzungsprodukten**

Klaus M. Biemel, Jürgen Conrad und
Markus O. Lederer*

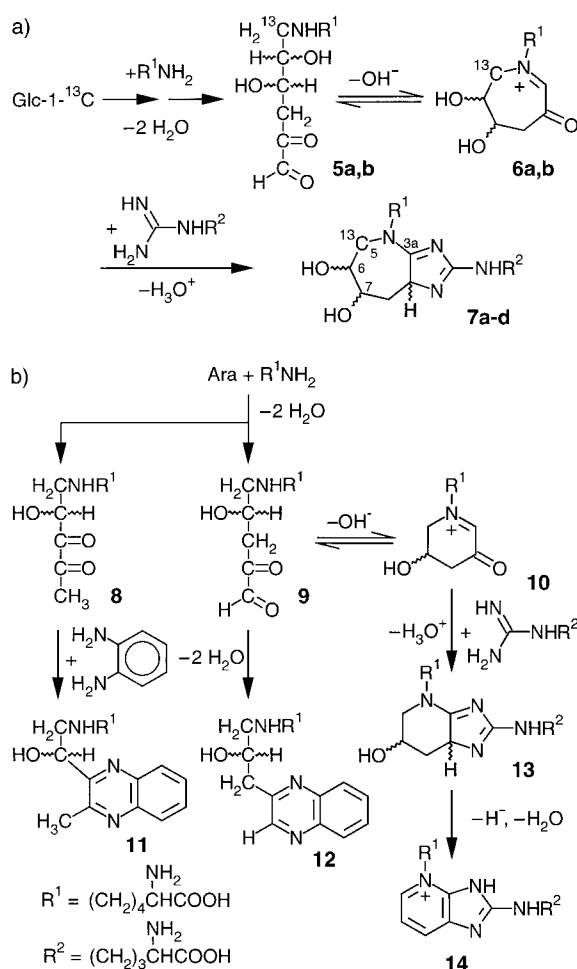
Die kovalente Quervernetzung von Proteinen ist eine der wichtigsten Modifikationen, die durch Maillard-Prozesse, also Reaktionen reduzierender Zucker mit Aminen, verursacht werden. Kovalent quervernetzte Proteine gehören zu den so genannten „Advanced Glycation End Products“ (AGEs), die oft aus Aminoketosen **1** (Schema 1) über hochreaktive Dicarboxylintermediate wie **2–4** entstehen.^[1–3] In langlebigem Bindegewebe und Matrixkomponenten akkumulieren



Schema 1. Das Amadori-Produkt 1-Desoxy-1-(N^6 -lysino)-D-fructose **1** und die in der Literatur bereits beschriebenen Desoxyosone **2–4**.

die AGEs altersabhängig und werden in verstärktem Maß bei Diabetes gebildet.^[4] Sie können zelluläre Rezeptoren aktivieren^[5] und zu krankhaften Veränderungen beitragen, die mit dem generellen Alterungsprozeß sowie Spätkomplikationen bei Diabetes, Arteriosklerose und Morbus Alzheimer in Zusammenhang stehen.^[1, 6–8] Um den Einfluss der Maillard-Reaktion auf diese Prozesse besser zu verstehen und um effektive Therapiemethoden gegen die AGE-Akkumulation im Gewebe zu entwickeln, ist es unabdingbar, die Bildungsmechanismen wichtiger Proteinquervernetzungsprodukte (Crosslinks) aufzuklären.

Wir haben kürzlich über die Bildung der Lysin-Arginin-Crosslinks Glucosepan **7** (Schema 2a), Pentosinan **13** und Pentosidin **14** (Schema 2b) aus den entsprechenden Kohlenhydraten und Aminoketosen (Amadori-Verbindungen) berichtet.^[2] Keines dieser Quervernetzungsprodukte entsteht aus den authentischen 3-Desoxyosonen wie 3-Desoxygluco-



Schema 2. a) Reaktionsweg für die Bildung des Lysin-Arginin-Crosslinks **7a–d**. b) Identifizierung der neuen Pentose-Didesoxyosone **8** und **9**. Aus Verbindung **9** wird vermutlich durch Ringschluß 6-(3-Hydroxy-5-oxo-2,3,4,5-tetrahydro-1-pyridinium)norleucin **10** gebildet, das dann mit der Argininseitenkette zu Pentosinan **13** und schließlich zu Pentosidin **14** reagiert.

son **2** (3-DOG, Schema 1), obwohl sie plausible Vorstufen wären. Daher wurde ein neuer Weg für die Entstehung von **7** aus der Aminoketose **1** postuliert,^[2] der aufzeigt, wie sich der siebengliedrige Ring von Glucosepan schließen könnte.

Verbesserte chromatographische Verfahren erlaubten jetzt, vier Stereoisomere **a–d** von Glucosepan **7** zu trennen und die Strukturen zweifelsfrei NMR-spektroskopisch zu charakterisieren;^[9a] bislang war lediglich die Trennung eines Stereoisomerenpaares **a,b** gelungen.^[10] Dieser Befund steht im Widerspruch zum postulierten Bildungsweg, der unter Beibehaltung der Stereochemie an C6 und C7 aus dem nativen Kohlenhydrat nur zu zwei Glucosepanisomeren führen würde. Bei der Bildung von **7** muss also die Konfiguration der stereogenen Zentren C6 oder/und C7 verloren gegangen sein, sodass vier bzw. acht Diastereoisomere resultieren. Aufgrund der großen Distanz zu den *S*-konfigurierten Stereozentren der Aminosäuren, konnten jedoch die 6,7,8a-Stereoisomere mit identischer relativer aber umgekehrter absoluter Konfiguration an diesen Zentren weder chromatographisch getrennt noch NMR-spektroskopisch unterschieden werden.^[9b] Daher sind bei freier C6,7,8a-Konfiguration nur vier der acht möglichen Diastereoisomere von **7** unterscheidbar.

[*] Priv.-Doz. Dr. M. O. Lederer, K. M. Biemel
Institut für Lebensmittelchemie (170), Universität Hohenheim
Garbenstraße 28, 70593 Stuttgart (Deutschland)
Fax: (+49) 711-459-4096
E-mail: ledererm@uni-hohenheim.de

Dr. J. Conrad
Institut für Chemie (130)
Garbenstraße 30, 70593 Stuttgart (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Frau S. Reeb, Institut für Chemie, Universität Hohenheim, und J. Rebell, Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart, danken wir für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

wir aus diesen Inkubationsgemischen zusätzlich N^6 -[2-Hydroxy-2-(3-methyl-2-chinoxaliny)ethyl]lysin **11** isoliert und zwar in dreifach höherer Ausbeute als **12**.^[9e] Da für Hexosen keine zu **11** homologe Struktur nachgewiesen werden konnte, scheint die Bildung von Didesoxyosonen wie N^6 -(2-Hydroxy-3,4-dioxopentyl)lysin **8** für Pentosen spezifisch zu sein.

Die geschilderten Befunde belegen zweifelsfrei, dass die neuen Didesoxyosone **5a,b** und **9** wichtige Zwischenstufen bei der Bildung bedeutender Proteinquervernetzungsprodukte sind. Die Bildung derartiger Strukturen aus Pentosen und Hexosen lässt sich somit über einen allgemeinen, gemeinsamen Reaktionsweg erklären, der auch zu einem besseren Verständnis fortgeschrittener Maillard-Prozesse beitragen kann.

Experimentelles

Chromatographische und spektroskopische Arbeitsverfahren: Die Geräte und Methoden für die präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), LC-(ESI)MS und NMR-Spektroskopie sind detailliert in Lit. [2] beschrieben. Ammoniumformiat-Puffer (10 mM, pH 4.0)-MeOH-Gradienten wurden für alle LC-Trennungen eingesetzt. Feinmassenbestimmungen wurden bei einer Auflösung von 1010 (10%-Tal-Definition) und mit Polyethylenglycol 350 Monomethylether als Massenreferenz durchgeführt. Folgende Scan-Bereiche und Referenzsignale wurden zur Kalibration herangezogen: **17a,b**, m/z 335–435, m/z 341.2175, 358.2441, 385.2438, 402.2703, 429.2700; **11** und **12**, m/z 290–390, m/z 297.1913, 314.2179, 341.2175, 358.2441, 385.2438.

7a–d: Die Synthese mit nativer D-Glucose und die Isolierung der *tert*-Butoxycarbonyl(*t*Boc)-Derivate von **7** sowie die Abspaltung der *t*Boc-Gruppen wurde wie in Lit. [10] beschrieben durchgeführt. Man erhält zwei Rohprodukte, die mit präparativer HPLC gereinigt wurden (Gradient: % MeOH (t [min]) 0(0)–5(5–7)–0(8–13); Detektion bei 254 nm). Die Fraktionen mit t_R = 5.4, 6.2, 7.7 und 8.9 min ergeben nach Lyophilisierung **7c**·3HCOOH (7.0 mg, 0.012 mmol, 0.3%), **7a**·3HCOOH (24.3 mg, 0.043 mmol, 1.1%), **7b**·3HCOOH (14.9 mg, 0.026 mmol, 0.7%) bzw. **7d**·3HCOOH (4.7 mg, 0.008 mmol, 0.2%). Die Synthese (Syntheseansatz auf 1/4 reduziert) wurde mit D-Glucose-1-¹³C (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, MA, USA) wiederholt und die Produkte analog isoliert.

17a,b, **11** und **12**: D-Glucose (360 mg, 2 mmol) bzw. D-Arabinose (300 mg, 2 mmol), N^6 -*t*Boc-L-Lysin (1.47 g, 6 mmol), *o*-Phenylendiamin (430 mg, 4 mmol), Diethylentriaminpentaessigsäure (5 mg, 0.013 mmol) und Phosphatpuffer (1.6 g, 1 mmol, pH 7.4) wurden in Wasser (10 mL) gelöst. Die jeweiligen Mischungen wurden mit Argon entgast, 2 d bei 70 °C gehalten und mit präparativer HPLC gereinigt (Gradient: % MeOH (t [min]) 5(0)–70(20)–100(22–25)–5(28–35); Detektion bei 318 nm). Fraktionen mit t_R = 19.9 min (Inkubation mit D-Glucose), t_R = 20.1 und 20.9 min (Inkubation mit D-Arabinose) wurden lyophilisiert, in 3 N HCl (2 mL) gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gehalten. Den pH-Wert stellt man durch langsame Zugabe von festem NaHCO₃ auf 7 ein, füllt das Volumen auf 4 mL auf und reinigt mit präparativer HPLC (Gradient: % MeOH (t [min]) 5(0)–55(12)–100(15–18)–5(20–25); Detektion bei 318 nm). Im Fall der D-Glucose-Inkubation erhält man nach Lyophilisierung aus der Fraktion bei t_R = 10.0 min die Verbindung **17a,b**·HCOOH (unmarkiert, 36.5 mg, 0.089 mmol, 4.5%); LC-(ESI)MS (Gradient: % MeOH (t [min]) 5(0)–95(30–35)–5(40–45), Cone Voltage 40 V): **17a**, t_R = 8.3 min, m/z (%) 401 (3) [$M+K$]⁺, 385 (4) [$M+Na$]⁺, 363 (100) [$M+H$]⁺, 219 (8), 187 (17); **17b**, t_R = 8.5 min, m/z (%) 401 (4) [$M+K$]⁺, 385 (6) [$M+Na$]⁺, 363 (100) [$M+H$]⁺, 219 (12), 187 (14); Feinmasse (Mittelwert aus 11 Messungen ± Standardabweichung): **17a,b**, m/z 363.2034 ± 0.0007 [$M+H$]⁺ (363.2032, berechnet für C₁₈H₂₇N₄O₄). Die Herstellung wurde mit D-Glucose-1-¹³C (Syntheseansatz auf 1/7 reduziert) wiederholt und die Produkte analog isoliert. Im Fall der Inkubation mit D-Arabinose lieferten die Fraktionen mit t_R = 10.5 und 11.3 min nach Lyophilisierung **11**·HCOOH (12.3 mg, 0.033 mmol, 1.6%) bzw. **12**·HCOOH (4.8 mg, 0.013 mmol, 0.6%); LC-

(ESI)MS (Gradient und Cone Voltage, siehe oben): **11**, t_R = 7.5 min, m/z (%) 371 (1) [$M+K$]⁺, 355 (2) [$M+Na$]⁺, 333 (45) [$M+H$]⁺, 175 (100), 159 (30); **12**, t_R = 8.3 min, m/z (%) 371 (1) [$M+K$]⁺, 355 (1) [$M+Na$]⁺, 333 (100) [$M+H$]⁺, 315 (5), 189 (5), 187 (4); Feinmasse (Mittelwert aus 10 Messungen ± Standardabweichung): **11**, m/z 333.1931 ± 0.0007 [$M+H$]⁺; **12**, m/z 333.1935 ± 0.0010 [$M+H$]⁺ (333.1927, berechnet für C₁₇H₂₅N₄O₃).

Eingegangen am 5. September 2001 [Z17857]

- [1] F. Ledl, E. Schleicher, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 597–626; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 565–594.
- [2] K. M. Biemel, O. Reihl, J. Conrad, M. O. Lederer, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 23405–23412.
- [3] a) D. B. Shin, F. Hayase, H. Kato, *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 1451–1458; b) M. A. Glomb, C. Pfahler, *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 515–523; c) S. Vasan, X. Zhang, A. Kapurniotu, J. Bernhagen, S. Teichberg, J. Basgen, D. Wagle, D. Shih, I. Terlecky, R. Bucala, A. Cerami, J. Egan, P. Ulrich, *Nature* **1996**, *382*, 275–278; d) R. H. Nagaraj, I. N. Shipanova, F. M. Faust, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 19338–19345; e) M. O. Lederer, R. G. Klaiber, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2499–2507; f) H. Odani, T. Shinzato, J. Usami, Y. Matsumoto, E. Brinkmann-Frye, J. W. Baynes, K. Maeda, *FEBS Lett.* **1998**, *427*, 381–385.
- [4] V. M. Monnier, R. R. Kohn, A. Cerami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 583–587.
- [5] a) A. M. Schmidt, O. Hori, J. Brett, S. D. Yan, J. L. Wautier, D. Stern, *Arterioscler. Thromb.* **1994**, *14*, 1521–1528; b) T. Kislinger, C. F. Fu, B. Huber, W. Qu, A. Taguchi, S. D. Yan, M. Hofmann, S. F. Yan, M. Pischetsrieder, D. Stern, A. M. Schmidt, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 31740–31749; c) A. M. Schmidt, S. D. Yan, S. F. Yan, D. M. Stern, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1498*, 99–111.
- [6] J. W. Baynes, S. R. Thorpe, *Diabetes* **1999**, *48*, 1–9.
- [7] C. A. L. S. Colaco, *The Glycation Hypothesis of Atherosclerosis*, Springer, Heidelberg, **1997**.
- [8] a) S. D. Yan, X. Chen, J. Fu, M. Chen, H. Zhu, A. Roher, T. Slattery, L. Zhao, M. Nagashima, J. Morser, A. Migheli, P. Nawroth, D. Stern, A. M. Schmidt, *Nature* **1996**, *382*, 685–691; b) A. Takeda, T. Yasuda, T. Miyata, Y. Goto, M. Wakai, M. Watanabe, Y. Yasuda, K. Horie, T. Inagaki, M. Doyu, K. Maeda, G. Sobue, *Acta Neuropathol.* **1998**, *95*, 555–558.
- [9] Siehe Hintergrundinformationen für a) ¹H- und ¹³C-NMR-Daten von **7a–d** (Tabelle 1); b) Überlegungen zur Zahl der beobachtbaren Diastereoisomere von **7** und Zuordnung ihrer relativen Konfiguration (Tabellen 1, 2 und Abbildung 1); c) ¹H- und ¹³C-NMR-Daten von **17a,b** (Tabelle 3); d) LC-Chromatogramme (Abbildung 2); e) ¹H- und ¹³C-NMR-Daten von **11** und **12** (Tabelle 3).
- [10] M. O. Lederer, H. P. Bühler, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1081–1088.
- [11] B. Huber, F. Ledl, *Carbohydr. Res.* **1990**, *204*, 215–220.
- [12] M. S. Feather, T. G. Flynn, K. A. Munro, T. J. Kubiseski, D. J. Walton, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1244*, 10–16.